云 南 植 物 研 究 1996; **18** (2): 139～144
Acta Botanica Yunnanica

细胞培养生产人参寡糖素降低成本的途径*

罗建平[2] 郑光植[1] 甘烦远[1] 彭丽萍[1]

([1] 中国科学院昆明植物研究所，昆明 650204) ([2] 兰州大学生物系，兰州 730000)

摘要 在人参（*Panax ginseng*）细胞悬浮培养中，以无离子水代替重蒸馏水，细胞生长速率和寡糖素产率分别降低 2.3%和 2.9%。用白糖代替蔗糖，细胞生长速率和寡糖素产率分别降低 1.74%和 1.23%，综合上述两方面结果，以无离子水和白糖分别替代原培养基中的重蒸馏水和蔗糖组成替代培养基，用替代培养基培养人参培养细胞，其生长速率可达 0.509gDW／L.d，寡糖素产率可达 1.443g／L，和原培养基相比，仅分别降低 1.74%和 1.23%，但每吨培养基的成本可以降低近 2800 元。用替代培养基培养细胞不改变细胞生长的时间进程，用于寡糖素制备的细胞最佳收获期在 20d 左右。

关键词 人参，细胞培养，寡糖素，成本降低

COST REDUCTION IN CELL CULTURE OF PANAX GINSENG FOR PRODUCTION OF OLIGOSACCHARINS

LUO Jian-Ping[2], ZHENG Guang-Zhi[1], GAN Fan-Yuan[1], PENG Li-Ping[1]

([1]*Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Scien. cs,* Kunming 650204)

([2]*Department of Biology, Lanzhou University,* Lanzhou 730000)

Abstract In cell suspension culture of *Panax ginseng* C. A. Mey, when non-ionic water was used instead of double distilled water, cell growth rate and oligosaccharin yield were decreased about 2.3% and 2.9% against controlled, respectively, when defined sugar was used instead of sucrose, cell growth rate and oliogsaccharin yield were decreased about 1.74% and 1.23% against controlled, respectively. As a result, substitutive medium involving non-ionic water and defined sugar was used instead of original medium in involving redistilled water and sucrose. When cells were suspended in the substitutive, cell growth rate and oligosaccharin yield were 0.509 gDW／L.d and 1.443g／L, respectively, which were slightly decreased by 1.74% and 1.23% as compared with control in cell suspension culture, while the cost of medium could be largely reduced about 3000 yuan／ t medium. Time course of cell suspension culture in substitutive medium was been unchanged, an appropriate period for oligosaccharin preparation from *P. ginseng* cultured cells was about 20 day.

Key words *Panax ginseng,* Cell culture, Oligosaccharin, Cost reduction

利用植物细胞工程生产药用物质能否应用于工业生产上，除具备生长快速，药用成分含量高而且稳

* 云南省科委“八五”重点攻关项目

1995-05-31 收稿，1995-08-15 修回

定的培养系统外，降低细胞培养中的生产成本是一个重要方面（朱蔚华等，1979）。细胞培养中的生产成本大部分是由有机碳源和电费构成（郑光植等，1982）。迄今为止，植物组织培养中采用的有机碳源都是分析纯蔗糖，用量大，价格高；配制培养基的水质大都采用重蒸馏水，植物组织培养中除通气、搅拌、温度调节等所需电费不易降低外，其它电费成本主要是用于制备重蒸馏水（罗士韦等，1988）。前文已筛选到一株细胞生长和寡糖素产率均较高的优良细胞株系（罗建平等，1994），本文在此基础上对培养基中有机碳源和水质进行了研究，试图降低细胞培养中的生产成本，为细胞大规模培养工业化生产人参寡糖素提供依据。

材料与方法

细胞材料

愈伤组织无性系是经过筛选的高产细胞系（罗建平等，1994），继代培养基为MS基本培养基，附加1.5mg／L的2.4-D和0.5mg／L的KT（罗建平等，1993）。26±1℃，暗培养。愈伤组织每30d转代1次。

细胞悬浮培养

取生长4周的新鲜愈伤组织于培养皿中，用接种铲压平压散，等份接种于250 mL的三角瓶中，内装50 mL培养基，26±1℃，120r／min的旋转式摇床暗中振荡培养，根据生长曲线，培养3周收获细胞。培养基同上，激素浓度为0.25mg／L的2，4-D和0.08mg／L的KT。剩余的愈伤组织冰冻干燥至恒重后计算平均细胞接种量。细胞平均接种量为75mgDW／瓶左右。

细胞生长速率的计算和寡糖素含量的测定

本文每一试验的试验处理均重复3～5次，取其平均产量计算生产速率。收获的细胞冰冻干燥至恒重，减去细胞接种量后为增加的细胞干重（g／L）。细胞生长速率以每升培养基每天增加的细胞干重克数表示（gDW／L.d）。冰冻干燥的人参细胞用蒸馏水浸泡，充分匀浆3次，沉淀用乙醇和氯仿-甲醇（1：1）依次提取3次，最后用丙酮洗涤，干燥得细胞壁粗提物。取细胞壁粗提物按谢启昆等（1986）的方法制备寡糖素。用苯酚-浓硫酸比色法测定寡糖素含量，以干重细胞的百分比表示（%DW），同时计算寡糖素产率，以每升培养基培养3周增加的干重细胞所获得的寡糖素克数表示（g／L）。用于细胞生长速率及寡糖素含量测定细胞干重总量均在50g以上。

结果和讨论

人参细胞培养中的水质

植物细胞工程实现工业化生产，需要成吨的水来配制培养液。采用重蒸馏水配制培养液必然大大增加生产成本，因此寻找成本低，容易得到且适合的重蒸馏水代用水是个关键问题。本文试验了不同水质对培养细胞生长和寡糖素产率的影响。结果如表1所示，用自来水和泉水配制培养液培养细胞时，细胞生长速率和寡糖素产率分别比用重蒸馏水配制培养液低25.9%，11.7%和47.7%，31.7%，不可取，而且自来水或泉水在配制培养基之前必须预处理，否则培养液经灭菌后有许多沉淀存在。用无离子水和普通蒸馏水配制培养液，细胞生长和寡糖素产率与用重蒸馏水配制培养液的差别不是太大。由于无离子水比普通蒸馏水更易大量制备，因此可用无离子水代替重蒸馏水来配制培养液，而细胞长速率和寡糖素产率只分别比用重蒸馏水降低2.3%和2.9%。虽然一些报道表明，对人参细胞的生长，自来水、井水和蒸馏水配制培养基与用重蒸馏水配制培养基的效果差不多（Hahn等，1981；Tabata，1977），但由于不同的蒸馏水特别是不同的自来水和井水的电阻率不同，水质相差很大，不能相互比较（罗士韦等，1988）。

表 1 不同水质对悬浮细胞生长和寡糖素产率的影响

Table 1 The influence of different water quality on cell growth rate and oligosaccharin yield of suspension cells

水质 Water quality	干重增加 Increased dry wt. (g DW / L)	生长速率 Growth rate (gDW / L.d)	寡糖素产率 Oligosaccharin yield (g / L)
自来水 Running water	6.948	0.331	0.632
泉水 Spring water	8.252	0.393	0.823
无离子水 Non-ionic water	9.126	0.435	1.169
蒸馏水 Distilled water	9.106	0.434	1.015
重蒸馏水 (CK) Redistilled water	9.344	0.445	1.205

人参细胞培养中的有机碳源

比较不同的有机碳源对细胞生长和寡糖素产率的影响表明，红糖和市售葡萄糖的效果远比蔗糖差，白糖和可溶性淀粉的效果也不如蔗糖好，在植物细胞培养中有机碳源均为分析纯蔗糖，用量大（30kg / t），如果能减少蔗糖用量也可降低成本。从图 1 可看出，对人参细胞的生长，25g / L 的蔗糖效果和 30g / L 蔗糖一样，寡糖素产率也无明显差别，但蔗糖用量仅减少 5g / L，对成本降低没有多大贡献。

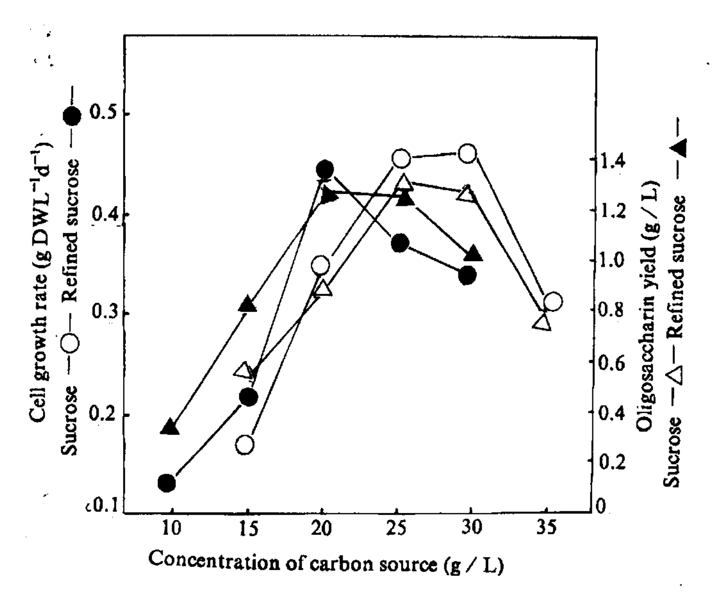


图 1 不同碳源浓度对细胞生长速率和寡糖素产率的影响

Fig.1 The influences on different concentration of carbon source cell growth rate and oligosaccharin yield

白糖和蔗糖的主要成分都是甘蔗糖，只是纯度不同，在浓度均为 30g / L 时，白糖效果不如蔗糖（表 2）可能是白糖中微量杂质如重金属、氯化物等抑制了细胞生长（罗士韦等，1988），不同白糖浓度试验结果表明，降低白糖浓度可以减少微量杂质对细胞生长的抑制（图 1），当浓度降至 20g / L 时，细胞生长速率最大为 425.3mgDW / L・d，寡糖素产率达 1.227g / L，仅比 25g / L 蔗糖组低 2.9%，因此在人参细胞培养中可用白糖代替蔗糖，可溶性淀粉在细胞内和培养液中易以淀粉粒形式存在，而且比蔗糖贵，不宜作为蔗糖的代用品（罗士韦等，1988）。

表 2 不同碳源对细胞生长和寡糖素产率的影响

Table 2 The influence of different carbon source on cell growth rate and oligosaccharins yield of suspension cells

碳 源 Carbon source	浓 度 concentration (g / L)	生长速率 Growth rate (gDW / L.d)	寡糖素产率 Oligosaccharins yield (g / L)
蔗 糖 (CK) Sucrose	30	0.460	1.321
白 糖 Refined sugar	30	0.321	0.841
红 糖 Brown sugar	32	0.095	0.302
市售葡萄糖 Oral glucose	30	0.144	0.429
可溶性淀粉 Starch	30	0.246	0.972

表 3 替代培养基对培养细胞生长速率和寡糖素产率的影响

Table 3 The combination effects of substitutive medium on cell growth rate and oligosaccharin yield

培养基 Medium	水 质 Water quality	碳 源 Carbon source (g / L)	生长速率 Growth rate (gDW / L.d)	寡糖素产率 Oligosaccharin yield (g / L)
原培养基 Original medium	重蒸馏水 Redistilled water	蔗 糖 Sucrose (30)	0.518	1.461
替代培养基 Substitutive medium	无离子水 Non-ionic water	白 糖 Refined sucrose (20)	0.509	1.443

表 4 细胞培养中培养基成本降低的分析

Table 4 The reduction of medium cost in cell culture

成 本 Cost	原培养基 Original medium		替代培养基 Substitutive medium	
	重蒸馏水 Redistilled water	蔗糖 Sucrose	无离子水 Non-ionic water	白糖 Refined sugar
元 / t 培养基 Yuan / t medium	2075.00	900.00	100.00	68.00
总成本 元 / t 培养基 Total cost Yuan / t medium	2975.00		168.00	

替代培养基的组合效果

用无离子水代替重蒸馏水，白糖代替分析纯蔗糖，配制培养基，试验结果表明（表 3），在代替培养基中培养细胞，细胞生长速率只比对照组降低约 1.74%，寡糖素产率也只比对照组降低约 1.23%（因寡糖素无市场售价，无法计算其寡糖素降低的价值）。比较原培养基和代替培养基中细胞生长的动态，从时间进程曲线（图 2）上可看出，替代培养基不改变细胞生长的动态过程，而且细胞生长速率和寡糖素产率之间还具有正相关性（罗建平等，1994）。细胞生长早期，随细胞干重的增加，寡糖素产率也增加；到 3 周左右，细胞干重增加最多，分别为 11.459 gDW / L 和 11.342 gDW / L（比对照组低 1.03%），寡糖素产率也达最高，分别是 1.546 g / L 和 1.524g / L（比对照组低 1.38%）；细胞生长后期，干重增加缓慢，且总的细胞干重稍有下降，而且细胞壁加厚，寡糖素产率随之下降。

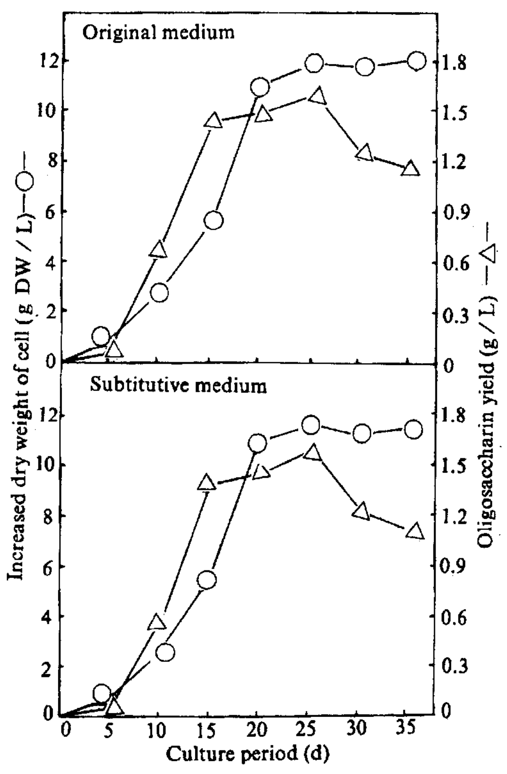


图 2 替代培养基和原培养基中细胞生长及寡糖素生产的动态曲线

Fig.2 The time course of cell suspension culture in original medium and substitutive medium

细胞培养中的成本分析

根据表 3 结果，替代培养基对细胞生长速率和寡糖速产率有轻微的影响，但是采用替代培养基，培养基的成本可大大降低。表 4 是培养基中水质和有机碳源的成本分析。

重蒸馏水需以蒸馏水（2000 元／t）为原料，经全玻璃电热纯水蒸馏器制备，每生产 1 吨重蒸馏水约需 600 小时，耗电约 300 度，成本约 75 元（按上海玻璃一厂出品的 1810A 型自动纯水蒸馏器，每度电 0.25 元计算）。无离子水以自来水为原料，离子交换树脂制备，每吨无离子水约需 16 小时（按上海医疗器械二厂出品的 70 型离子交换纯水器计算）。上海华震科技贸易公司出品的 DH 型离子交换纯水装置，其生产成本低于蒸馏水，而蒸馏水的市售价为 100 元／t，无离子水的成本顶多为 100 元／t。因此，用无离子水替代重蒸馏水，不仅满足细胞大规模培养用水，而且能降低电费成本 2075.00 元／t 水。分析纯蔗糖 30.00 元／kg，一吨培养基成本是 900.00 元，而白糖市价为 3.40 元／kg，用量比蔗糖少 1／3（图 1），配制一吨培养基成本是 68.00 元，细胞大规模培养时，仅白糖替代分析纯蔗糖，成本就可降低 832.00 元／t 培养基。

综合以上结果和分析，虽然用替代培养基培养人参细胞时，生长速率和寡糖素产率下降 1%—2%左右，但是培养基成本降低了约 2800 元／t 左右。

小　结

药用植物组织培养在工业生产上应用的实现，主要取决于该药用于产品的社会需求量及其生产成本。一些抗癌或治疗心血管等病很有效的药物，由于资源极为乏匮，市场价格昂贵，即使生产成本很高，也能实现工业化生产。但一般来说只有生产成本低, 工业化生产才能盈利，也才能实现工业化生产（朱蔚华等，1979）。细胞大规模培养生产人参寡糖素中培养成本降低应从两方面着手，一方面是通过筛选和优化获得稳定的高产率的细胞株系，这方面工作已在前文报道（罗建平等，1994），另一方面就是采用替代培养基。本文结果表明人参细胞培养的培养基可以采用代用成分，使细胞培养中的成本大幅度降低，从而更适应工业化和商业化规模生产的可行性。

参 考 文 献

朱蔚华，李新兰，张荫林等，1979. 人参组织培养的研究 2. 愈伤组织的继续培养与观察. 中草药通讯，**3**: 39

郑光植，何静波，王世林，1982. 药用植物组织培养的研究 Ⅳ. 三分三组织培养中的成本问题. 植物学报，**24**: 209

罗士韦，许智宏主编，1988. 经济植物组织培养. 北京：科学出版社，116

罗建平，郑光植，甘烦远，1994. 高产人参寡糖素培养细胞克隆系的筛选. 植物学报，**36**(4)：209

罗建平，郑光植，甘烦远，1993. 人参培养细胞的单细胞克隆. 生物工程学报，**9**(4)：337

谢启昆，刘 涤，丁家宜等主编，1986. 药用植物组织培养. 上海：上海科学技术出版社，39

Hahn M G, Darvill A G, Albersheim P, 1981. Host-Pathogen interaction XIX. The endogenous elictors, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol,* **68**: 1161

Tabata M, 1977. In Barz W. (eds.), Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application, Springer-Verlang, Berlin, 3

云 南 植 物 研 究 1996; **18** (2): 144

Acta Botanica Yunnanica

十字苣苔属一新记录种

朱 华 王 洪 李保贵

(中国科学院西双版纳热带植物园, 云南勐腊 666303)

STAURANTHERA, A NEW RECORD FROM CHINA

ZHU Hua, WANG Hong, LI Bao-Gui

(*Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences,* Mengla, Yunnan, 666303)

关键词 大花十字苣苔, 中国分布新记录

Key words *Stauranthera grandiflora,* New to China

大花十字苣苔 (新拟)

Stauranthera grandiflora Benth. Scroh. Ind: 57(1835)——Sphalmate ut "grandifolia"; C. B. Clarke in A. et C. DC. Monogr. Phanerog. **5:** 190 (1883), and in Hook. f. Fl. Brit. India **4:** 371 (1884); B. L. Burtt in J. Aronold. Arbor. **65**(1): 131 (1984).

模式 (Type): 马来半岛, 槟榔屿(Penang), Wallich 6395(K).

——*Glossanthus ? grandiflorus* Benth. in Wall. Cat. 6395 (1832). nomen nudum.

分布: 印度(尼科巴岛); 孟加拉国(吉大港), 泰国, 缅甸(密支那), 马来西亚(槟榔屿), 印度尼西亚(苏门答腊), 中国(云南勐腊), 该种为中国分布新记录。

检查标本:

中国(China): 云南(Yunnan), 西双版纳, 勐腊补蚌, 朱华、王洪 910808（**HITBC**），海拔 800 m。**孟加拉国**（**Bangladesh**）：吉大港（Chittagong），C. B. Clarke 19838（**K**），19536（**K**），同地，Wanger 490（K）。**缅甸**（**Burma**）：密支那（Myitkyina），Mckee 6243（**K**），Moulmein，Parish. s. n.（无号）（**K**）。本属约 10 种，分布于亚洲南部至东南部，我国原记录一种（*Stauranthera umbrosa*（Grift.）Clarke，产云南南部，广西西南部和海南。

1996-01-22 收稿